

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-295996

(43)Date of publication of application : 24.10.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12N 1/21  
C12P 19/32  
// (C12N 1/21  
C12R 1:15 )  
(C12P 19/32  
C12R 1:15 )

(21)Application number : 2000-023779

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 01.02.2000

(72)Inventor : TAKANO YUTAKA  
IKEDA MASATO  
FUJIO TATSURO

(30)Priority

Priority number : 11029738    Priority date : 08.02.1999    Priority country : JP

## (54) PRODUCTION OF PURINE NUCLEOTIDE

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a purine nucleotide for seasoning and so on by culturing a microorganism which produces a precursor of the purine nucleotide and into which a DNA was introduced, which DNA can induce and express an enzyme which can synthesize the purine nucleotide from the precursor.

**SOLUTION:** This purine nucleotide is obtained by culturing a microorganism [e.g. *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872/pLAC857 (FERM BP-6639)] which has an ability of producing a precursor (e.g. 5'-xanthylic acid) of the purine nucleotide and into which a DNA was introduced, which DNA can induce and express an enzyme (e.g. 5'-xanthylic acid amidase) which can synthesize the purine nucleotide (e.g. 5'-guanylic acid) from the precursor in a medium, forming and accumulating the precursor of the purine nucleotide in the medium, inducing and expressing the enzyme which can synthesize the purine nucleotide from the precursor in the medium, forming and accumulating the purine nucleotide from the precursor in the medium, followed by collecting the purine nucleotide.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-295996

(P2000-295996A)

(43) 公開日 平成12年10月24日 (2000. 10. 24)

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テラコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/21		1/21	
C 1 2 P 19/32		C 1 2 P 19/32	Z
// (C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:15)			
審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-23779 (P2000-23779)	(71) 出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22) 出願日	平成12年2月1日 (2000. 2. 1)	(72) 発明者	高野 裕 山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工業株式会社技術研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平11-29738	(72) 発明者	池田 正人 山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工業株式会社技術研究所内
(32) 優先日	平成11年2月8日 (1999. 2. 8)	(72) 発明者	藤尾 達郎 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社 本社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 プリンヌクレオチドの製造法

(57) 【要約】

【課題】 同一発酵槽内で効率よくヌクレオチドを製造するためのプロセスの開発を課題とする。

【解決手段】 本発明によれば、プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物を培地に培養し、該培養物中にプリンヌクレオチドの前駆物質を生成蓄積させた後、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素を誘導発現させ、該培養物中に該前駆物質よりプリンヌクレオチドを生成蓄積させ、該培養物中より該プリンヌクレオチドを採取することを特徴とする。プリンヌクレオチドの製造法および該製造法において用いることのできる微生物を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物を培地に培養し、該培養物中にプリンヌクレオチドの前駆物質を生成蓄積させた後、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素を誘導発現させ、該培養物中に該前駆物質よりプリンヌクレオチドを生成蓄積させ、該培養物中より該プリンヌクレオチドを採取することを特徴とする、プリンヌクレオチドの製造法。

【請求項2】 プリンヌクレオチドの前駆物質が5'-キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が5'-キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、請求項1記載の製造法。

【請求項4】 プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-イノシン酸である、請求項1記載の製造法。

【請求項5】 微生物が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属からなる属より選ばれる微生物である、請求項1記載の製造法。

【請求項6】 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、請求項1記載の製造法。

【請求項7】 プリンヌクレオチドを合成可能な酵素が、高温、高pHおよび高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることにより誘導発現されることを特徴とする、請求項1記載の製造法。

【請求項8】 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、請求項7記載の製造法。

【請求項9】 プリンヌクレオチド前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNA。

【請求項10】 高温、高pHおよび高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることにより、プリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできる、請求項9記載のDNA。

【請求項11】 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、請求項10記載のDNA。

【請求項12】 DNAが、pLAC857またはpIGK2である、請求項9または10記載のDNA。

【請求項13】 プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物。

【請求項14】 プリンヌクレオチドの前駆物質が5'-キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が5'-キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、請求項13記載の微生物。

【請求項15】 プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、請求項13記載の微生物。

【請求項16】 プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-イノシン酸である、請求項13記載の微生物。

【請求項17】 微生物が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属からなる属より選ばれる微生物である、請求項13記載の微生物。

【請求項18】 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、請求項13記載の微生物。

【請求項19】 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pLAC857 (FERM BP-6639) またはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pIGK2 (FERM BP6638) である、請求項18記載の微生物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、調味料として大きな需要のあるプリンヌクレオチドの製造法および該製造法に用いることのできる微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】 5'-グアニル酸（以下、GMPと略す）と5'-イノシン酸（以下、IMPと略す）は強い呈味性を示すプリンヌクレオチドであり、化学調味料成分として広く用いられている。

【0003】 これら呈味性ヌクレオチド類の製法として、酵母菌体から抽出したRNAをリボヌクレアーゼP1により加水分解した後に必要な5'-ヌクレオチドを分離精製する方法【Food Technol., 18, 287 (1964)】、IMPを生産する能力を有する微生物を用いて、IMPを直接発酵生産する方法【Agricultural and Biological Chemistry, 46, 2257 (1982)】、イノシンやグアノシン等のヌクレオシド類を化学的リン酸化によりヌクレオチドに変換する方法【Bulletin of the Chemical Society of Japan, 42, 3505 (1969)】、バチルス・メガテリウムの変異株を用いて5'-アミノ-4-イミダゾ

ールカルボキサミドリボンド（以下、AICARと略す）を発酵法で生産し、AICARから化学的合成法によって製造する方法【Biotechnol. Bioeng., 9, 329 (1967), J. Org. Chem., 32, 1825 (1967)】、5'-キサンチル酸（以下、XMPと略す）生産性のコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの変異株を培地に培養してXMPを生成蓄積させ、次いでセルフクローニングによりXMPアミナーゼ（別名GMP合成酵素）活性を強化した大腸菌菌体を培養して酵素源とし、XMPから酵素反応によってGMPを製造する方法【Biosci. Biotech. Biochem., 51, 840 (1997), 特開昭63-233798】等が知られている。

【0004】以上をまとめると、これまで開発された呈味性ヌクレオチドの生産法は原理的に次の3法に大別できる（高尾彰一編、応用微生物学、文永堂出版（1996））。即ち、

- ①酵母RNAを微生物酵素または化学的に分解する方法（RNA分解法）、
  - ②糖と窒素源・リン酸源を含む培地で微生物の変異株を培養し、ヌクレオチドを直接生産させる方法（直接発酵法）、
  - ③発酵法でヌクレオチド合成の中間体を生産したのち、化学的または酵素的にヌクレオチドに変換する方法（発酵と化学合成または酵素転換の複合プロセス）である。
- 【0005】上記①のRNA分解法は、呈味性のプリンヌクレオチドとほぼ等量のピリミジンヌクレオチドが副生してくることから、精製工程は煩雑とならざるを得ない。②の直接発酵法は、一般的にヌクレオチドの膜透過性が障害となるため細胞外に蓄積のヌクレオチドを生成蓄積できる高生産菌の育種が容易ではなく、経済的に満足いく生産性を得るのが難しい。特にGMPについては、これまで直接生産については知られていない。ただし、XMPは例外的に蓄積生成蓄積することが知られている（高尾彰一編、応用微生物学、文永堂出版（1996））。そのため、現在、経済的に有利な呈味性ヌクレオチドの製造法として、③の発酵と化学合成または酵素転換との複合プロセスが工業的に広く用いられている。

【0006】この複合プロセスでは、全体の生産性向上の1つのポイントは、前段の発酵工程におけるヌクレオチド合成中間体の生産収率を高めることにある。従って、XMP、グアノシンまたはイノシンの高生産微生物が数多く育種されている【Agricultural and Biological Chemistry, 42, 399 (1978), Agricultural and Biological Chemistry, 43, 1739 (1979), Agricultural and Biological Chemistry, 46, 2347 (1982)】。

【0007】後段の工程、即ち化学的または酵素的にヌクレオチドに変換する工程も種々の方法が開発されている。化学的方法としては、部位特異的なリン酸化反応（ヌクレオシド→5'-ヌクレオチド）【Bulletin of the

Chemical Society of Japan, 42, 3905 (1969)】が工業的に用いられている。しかしながら、化学的リン酸化反応のためには、リン酸基受容体であるヌクレオシドを必要な純度まで精製する中間工程が必要であり、また、発酵生産に用いた発酵槽とは別の化学反応槽も必要となる。そのため、もう一方の酵素的アミノ化法およびリン酸化法が注目され、種々検討されている。これまでにアミノ化に関してはXMPアミナーゼによる方法が知られている（高尾彰一編、応用微生物学、文永堂出版（1996））。

【0008】また、リン酸化については、ホスホトランスフェラーゼ、キナーゼあるいはホスファターゼを利用したリン酸化法が知られており、この中ではキナーゼあるいはホスファターゼを利用した反応がより効率の良い方法として検討されている。例えば、エシェリヒア・コリのイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ菌株を用いる5'-ヌクレオチドの製造法（WO91/08286号）、エキシグオバクテリウム・アセチリカムのイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を導入したコリネバクテリウム・アンモニアゲネス菌株を用いる5'-ヌクレオチドの製造法（WO96/30501号）、モルガネラ・モルガニのフォスファターゼ遺伝子にランダム変異を付与した遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ菌株を用いる5'-ヌクレオチドの製造法（特開平9-37785, 特開平10-201481）がある。

【0009】リン酸基供与体としては、種々の化合物が検討されており、例えば、p-ニトロフェニルリン酸を用いる方法（特公昭39-2985号）、無機リン酸を用いる方法（特公昭42-1186号、特公昭49-44350号）、ポリリン酸を用いる方法（特開昭53-56390号）、アセチルリン酸を用いる方法（特開昭56-82098号）、ATPを用いる方法（特開昭63-230094号）、ポリリン酸、フェニルリン酸、カルバミルリン酸を用いる方法（特開平9-37785号）、ピロリン酸を用いる方法（特開平9-37785, 特開平10-201481）等が知られている。

【0010】しかしながら、これらの方法にあっては使用する基質が高価または不安定であったり、反応副生物が生じるため精製工程が煩雑になる等、工業的に有利な方法とはいえない。このため、経済性を満たす実用的な方法として、微生物が糖代謝の過程で無機リン酸を利用してAMPまたはADPからATPを再生させるATP再生系を利用したヌクレオチド生産システムが開発されている。例えば、XMP生産菌が有しているグルコースを代謝してATPを生合成する活性をATP再生系として用いる方法がある。このATP再生系と、XMPおよびATPからGMPを生成する能力を持つ微生物のXMPアミナーゼ活性を共役させることによって、ATPの代わりに安価なグルコースと無機リン酸をATP再生基質とするGMPの製法がある【Biosci. Biotech. Biochem., 61, 840 (1997)】。また、この方法で、酵素とし

てイノシンキナーゼを利用するIMPの製造法もある  
(特開昭63-230094)。

【0011】直接発酵によりXMP、グアノシンまたはイノシンを生産させる発酵工程と、それら発酵産物を酵素的にGMPまたはIMPに転換する反応工程からなるGMPまたはIMPの製造プロセスでは、2種の微生物が用いられる。即ち、前段の発酵工程では、XMP、グアノシンまたはイノシンの生産菌として育種された変異株が用いられる。後段のアミノ化またはリン酸化を行う反応工程では、XMPアミナーゼ活性またはイノシングアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を高発現化させた微生物が用いられる。

【0012】後段の反応において必要となるATPは、後段の転換菌だけでなく、発酵を終了した前段の生産菌が有しているATP再生活性が利用される。従って、後段の反応工程はXMPアミナーゼ活性またはイノシングアノシンキナーゼ活性とATP再生活性を2菌体間で共役させたシステムとなっている。

【0013】全体のプロセスの概要は、以下の通りである。まず大型発酵槽で生産菌を糖質と窒素源を主原料とする培地に培養してXMP、グアノシンまたはイノシンを生産蓄積させる。一方、別の小型発酵槽で転換菌を培養する。前段の発酵が終了した時点で、この大型発酵槽に別に培養した転換菌を添加して、安価なエネルギー供与体およびリン酸基供与体存在下でリン酸化またはアミノ化反応を行う。

【0014】以上のような酵素反応による製造プロセスは、化学的にリン酸化を行う方法に比べ前述の理由により有利であるものの、転換菌を培養するための小型発酵槽が必要である。転換菌を添加する分、前段の発酵工程での濃度を減らす必要があり、したがって目的ヌクレオチドのバッチ当たりの得量が低下する等の点で充分に効率的なプロセスとはいえない。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、同一発酵槽内で効率よくプリンヌクレオチドを製造するためのプロセスの開発を課題とする。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素の遺伝子を、プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有する発酵菌に保有させ、その発現を発酵工程および反応工程の両工程間で制御できれば、一微生物のみで、プリンヌクレオチドの前駆物質の発酵に引き続いて、該前駆物質よりプリンヌクレオチドの転換反応を一つの発酵槽内で行うことが可能な、より優れたプリンヌクレオチドの製造プロセスになる可能性があると考え、鋭意検討を重ねた。その結果、本発明を完成するに至った。

【0017】即ち、本発明は以下(1)～(19)に関

する。

(1) プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物を培地に培養し、該培養物中にプリンヌクレオチドの前駆物質を生産蓄積させた後、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素を誘導発現させ、該培養物中に該前駆物質よりプリンヌクレオチドを生産蓄積させ、該培養物中より該プリンヌクレオチドを採取することを特徴とする、プリンヌクレオチドの製造法。

【0018】(2) プリンヌクレオチドの前駆物質が5'-キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が5'-キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、上記(1)記載の製造法。

(3) プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、上記(1)記載の製造法。

【0019】(4) プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-イノシン酸である、上記(1)記載の製造法。

(5) 微生物が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属からなる属より選ばれる微生物である、上記(1)記載の製造法。

【0020】(6) 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、上記(1)記載の製造法。

(7) プリンヌクレオチドを合成可能な酵素が、高温、高pHおよび高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることにより誘導発現されることを特徴とする、上記(1)記載の製造法。

【0021】(8) 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、上記(7)記載の製造法。

(9) プリンヌクレオチド前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNA。

【0022】(10) 高温、高pHおよび高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることにより、プリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできる、上記(9)記載のDNA。

(11) 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、上記(10)記載のDNA。

【0023】(12) DNAが、pLAC857またはpIGK2である、上記(9)または(10)記載の

DNA。

(13) プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物。

【0024】(14) プリンヌクレオチドの前駆物質が5'-キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が5'-キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である。上記(13)記載の微生物。

(15) プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である。上記(13)記載の微生物。

【0025】(16) プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がイノシングアノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-イノシン酸である。上記(13)記載の微生物。

(17) 微生物が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属からなる属より選ばれた微生物である。上記(13)記載の微生物。

【0026】(18) 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスである。上記(13)記載の微生物。

(19) 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pLAC857 (FERM BP-6639)またはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pIGK2 (FERM BP-6638)である。上記(18)記載の微生物。

以下に本発明を詳細に説明する。

【0027】

【発明の実施の形態】本発明は、直接発酵によりプリンヌクレオチドの前駆物質を生産させる発酵工程と、該発酵工程で生産された前駆物質を酵素的にプリンヌクレオチドに転換する反応工程を単一の微生物を用いて一つの発酵槽内で連続的に行うプロセスである。

【0028】該プロセスを成立させるために、本発明者らが見出した重要な要件は以下の3点である。即ち、第1に、直接発酵によりプリンヌクレオチドの前駆物質を生産させる発酵工程では、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子の発現が発酵に実質的に影響を及ぼさないレベルに抑えられていること。

【0029】該酵素の発現が抑えられない場合には、該酵素の活性により、発酵中に細胞内にプリンヌクレオチドが生成蓄積し、下記理由により発酵収率が低下する。プリンヌクレオチドとして、GMPが蓄積した場合に、プリン合成経路上の鍵酵素のフィードバック制御

が誘発され、XMPの生産が止まってしまう。IMPが蓄積した場合には、イノシン生成との間で無益サイクル(Futile cycle)が形成され、ATPの浪費が起こる。このように、細胞内でのプリンヌクレオチドの生成蓄積は発酵収率の低下を招くことになり、経済的に不利となる。

【0030】第2に、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程においては、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素活性が十分に誘導されること。第3に、発酵を終えかつ誘導処理を施した生産菌に充分なATP再生活性と転換反応にあずかるリン酸化またはアミノ化活性が保持され、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程においてそれが十分に機能すること。

【0031】以上の3点である。本発明に用いられる微生物は、プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ、ATP再生活性を持つ微生物であれば、野生株、変異株、細胞融合株、形質導入株あるいは組換えDNA技術を用いて造成した組換え株のいずれであっても特に限定されない。該微生物として、好適には、核酸発酵やアミノ酸発酵に用いられているコリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属に属する微生物をあげることができる。強力なATP再生活性を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスは、更に好適な微生物としてあげることができる。

【0032】プリンヌクレオチドの前駆物質としては、XMP、グアノシン、イノシン、アデノシン等をあげることができる。ATP再生活性とは、微生物が経路をエネルギー供与基として代謝する過程で無機リン酸を利用してAMPもしくはADPからATPを再生させる活性のことをいう。このATP再生系は、解糖系、TCAサイクル、電子伝達系等の経代謝系およびエネルギー代謝系の一部であり、ほとんどあらゆる微生物がその活性を有している。

【0033】本発明に用いられる微生物の具体例としては、例えば以下の菌株およびこれらから誘導された変異株をあげることができる。

【0034】

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872  
コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 21295  
コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 21477  
コリネバクテリウム・グルタミンATCC 13032  
コリネバクテリウム・グルタミンATCC 14067  
コリネバクテリウム・グルタミンATCC 13869  
エシェリヒア・コリATCC 14948  
エシェリヒア・コリATCC 11303  
エシェリヒア・コリATCC 9637  
バチルス・サチルスATCC 14618

【0035】本発明に用いられるプリンヌクレオチドの

前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素としては、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素であればいずれも用いることができ、XMPアミナーゼ、イノシングアノシンキナーゼ、ホスファターゼ、アデニレートキナーゼ等をあげることができる。

【0036】これら酵素をコードするDNAとして、例えば、以下のものをあげることができる。XMPアミナーゼをコードする遺伝子として、エシェリヒア・コリに由来するもの【Nucleic Acids Res., 13, 1303 (1985)】、バチルス・サチリスに由来するもの【Nucleic Acids Res., 18, 5710 (1990)】、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (Genbank accession no. q2765074) に由来するもの等をあげることができる。

【0037】イノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子として、エシェリヒア・コリに由来するもの (WO 91/08286号)、エキシグオバクテリウム・アセチリカムに由来するもの (WO96/30501号) 等をあげることができる。ホスファターゼをコードする遺伝子としてモルガネラ・モルガニに由来するもの (特開平9-37785、特開平10-201481) 等をあげることができる。アデニレートキナーゼをコードする遺伝子としてサッカロミセス・セレビシエに由来するもの【J. Biol. Chem., 263, 19468 (1988)】をあげることができる。

【0038】プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子は、公知の方法により取得することができる。例えば、XMPアミナーゼをコードする遺伝子の場合には、XMPアミナーゼ構造遺伝子の配列の両末端に位置する配列をもとにプライマーを合成する。ついで本プライマーとエシェリヒア・コリ染色体DNA、バチルス・サチリス染色体DNAまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス染色体DNAからポリメラーゼ・チェーン・リアクション法 (PCR法) によりXMPアミナーゼ構造遺伝子を取得できる。

【0039】イノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子の場合には、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子の配列の両末端に位置する配列をもとに合成したプライマーとエシェリヒア・コリ染色体DNAまたはエキシグオバクテリウム・アセチリカム染色体DNAからPCR法によりイノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子を取得できる。同様に、PCR法を用いることでモルガネラ・モルガニ染色体DNAからホスファターゼ構造遺伝子、またサッカロミセス・セレビシエ染色体DNAからアデニレートキナーゼ構造遺伝子を取得できる。

【0040】このようにして取得されたプリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を適当な誘導発現ベクターの誘導発現制御が可能な転写・翻訳シグナルの支配下に配することにより、該遺伝子の発現を制御できる組換え体ブラ

スミドを得ることができる。

【0041】誘導発現ベクターとしては、用いる微生物内で複製可能であると同時に、以下の3条件を満たせば特に限定されるものではない。第1に、直接発酵によりプリンヌクレオチドの前駆物質を生産させる発酵工程では、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子の発現を発酵に実質的に影響を及ぼさないレベルに抑えられること。

【0042】第2に、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程に移行する前に行う誘導処理によって、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素の活性を十分に誘導できること。第3に、該誘導方法が、誘導処理後も生産菌に十分なATP再生活性と転換活性が保持されるような方法であること。

【0043】上記3条件を満たすベクターとして、例えば、P<sub>1</sub>プロモーター/cI857リプレッサー遺伝子を保有し、高温で誘導されるpPAC31 (WO98/12343号)、lacプロモーター/lacI<sub>ts</sub>リプレッサー遺伝子を保有し、高温で誘導されるpBB1 [Gene, 70, 415 (1988)]、P<sub>1</sub>プロモーター/cI857リプレッサー遺伝子を保有し、高pHで誘導されるpRK248cits [Gene, 97, 125 (1991)]、p<sub>roU</sub>発現制御領域を保有し、高浸透圧下で誘導されるpOSEX2 [Gene, 151, 137 (1994)]、trcプロモーター/lacI<sup>r</sup>リプレッサー遺伝子を保有し、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) で誘導されるpTrc99A [Gene, 69, 301 (1988)]、araBADプロモーター/araCリプレッサー遺伝子を保有し、L-アラビノースで誘導されるpAL9181 [Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 205 (1992)]、糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることで誘導されるベクター等のエシェリヒア・コリで構築されている誘導発現ベクターをあげることができる。

【0044】更に、これら誘導発現ベクター上の、発現制御に関わる転写・翻訳シグナル領域が、変異技術または組換えDNA技術で改変されたベクターも、同様に用いることができる。これら既知の誘導発現ベクターあるいは、それらから更に改良されたベクターを、大腸菌以外の宿主で利用する場合には、該宿主で機能する複製起点を挿入すればよい。例えばコリネバクテリウム・アンモニアゲネスで利用する場合には、該ベクターにコリネバクテリウム・アンモニアゲネスで機能するコリネバクテリウム・グルタミカム由来のプラスミドが有する複製起点等を挿入すればよい。

【0045】コリネバクテリウム・グルタミカム由来のプラスミドとしては、例えばpCG1 (特開昭57-13450号)、pCG2 (特開昭58-35197号)、pCG4 (特開昭57-183799号)、PAM330 (特開昭58-67699号)、pAG1、pAG3、pAG14、pAG50 (特開昭62-166890号) があげられる。

10

20

30

40

50



【0046】コリネバクテリウムにおいて、温度を上昇させることにより誘導可能なベクターとしては、例えば大腸菌において高温で誘導されるベクターであるpPAC31に含有されるP<sub>1</sub>プロモーター/cI857リプレッサー遺伝子と、コリネバクテリウム内で自律複製可能なベクターとを連結して作製されるプラスミドベクター等をあげることができる。酢酸等の非糖質炭素源で誘導可能なベクターpCEX2（特開平3-224259号）等を好適なベクターとしてあげることができる。一方、これらの誘導発現ベクター上の遺伝子発現制御に関わる転写・翻訳シグナルが、用いる微生物内で機能しないか、機能しても上記3つの要件を十分に満たさない場合には、該転写・翻訳シグナル領域を、変異技術または組換えDNA技術を用いて、上記3つの要件を十分満たすように改良するか、該微生物に適用可能な誘導発現システムを新たに開発する必要がある。前者の場合には、用いる微生物で既に知られている転写・翻訳シグナル配列を参考にして、例えば、サイト・ダイレクテッド・ミュータジェネシス(Site-directed mutagenesis)などの方法により実施することができる。後者の場合には、エシェリヒア・コリ等で構築された上述のような一般的な誘導発現システムの開発方法に準じ開発構築することができる。

【0047】誘導発現系を備えた微生物として、好適には、大腸菌において高温で誘導されるベクターであるpPAC31に含有されるP<sub>1</sub>プロモーター/cI857リプレッサー遺伝子と、コリネバクテリウム内で自律複製可能なベクターとを連結して作製される温度誘導型プラスミドベクター、または安価な酢酸の添加で発現を制御できるpCEX2を遺伝子誘導発現システムとして用いて造成したコリネバクテリウム・アンモニアゲネス等をあげることができる。

【0048】本発明では、上記3条件を満たせば、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子がベクタープラスミド上に存在しても、染色体に組み込まれていても問題ではない。即ち、該遺伝子の発現が所望のように制御可能であれば、プラスミドの保有株、遺伝子の染色体組み込み株のいずれであっても特に限定されない。

【0049】プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を含む有する誘導発現プラスミドをプリンヌクレオチドの前駆物質を生産する微生物に導入する方法として、プロトプラスト法、電気パルス法、塩化カルシウム法、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）等に記載の、通常使用される方法をあげることができる。

【0050】例えば、宿主菌としてコリネバクテリウム属細菌を用いる場合には、プロトプラスト法（特開昭57-183799号）、電気パルス法（特開平2-207791号）が特

に有効である。宿主菌としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、塩化カルシウム法（J.Mol.Biol., 53, 159 (1970)）等も用いることができる。

【0051】このようにして得られたプリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を導入した本発明の形質転換体を、炭素源、窒素源、無機物、更に必要に応じて有機微量栄養素を含有する通常の培地で培養し、プリンヌクレオチドの前駆物質を生成した後、熱処理または酢酸添加等の誘導処理を施すことにより、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現できる。

【0052】上記発酵工程で用いられる培地の炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜、蔗糖蜜、澱粉加水分解物等の炭水化物、エタノール、グリセリン、ソルビトール等のアルコール類、ビルビン酸、乳酸等の有機酸、グリシン、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸等、該微生物が資化可能であるものであればいずれも使用できる。これらの使用濃度は、5～30%が好ましい。

【0053】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機および有機アンモニウム塩、尿素、各種アミノ酸、ペプトン、NZアミン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイプリカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミール又はその消化物等の種々のものが使用できる。

【0054】無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム等を用いることができる。用いる微生物がアミノ酸、核酸、ビタミン等特定の栄養物質を生育に要求する場合には、培地にこれら物質を適量添加する。

【0055】培養は、振盪培養または通気攪拌培養等の好気条件下で行う。培養温度は一般に26℃～37℃が最適である。培養期間は、通常1日～5日間である。プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を発現させるための誘導処理条件としては、例えば、pPAC31またはpBB1を利用する場合には、通気攪拌条件下、37℃～42℃で1～24時間、pRK248c1tsを利用する場合には、pH9で1～24時間、pOSEX2を利用する場合には、50mmol/L～300mmol/L NaCl存在下で1～24時間、pTrc99Aを利用する場合には0.1mmol/L～0.5mmol/L IPTG存在下で1～24時間、pAL9181を利用する場合には0.2% L-アラビノース添加条件下で1～24時間、pCEX2を用いる場合には0.1%～2% 酢酸アンモニウムまたは酢酸ナトリウム添



加条件下で1~24時間、処理することが望ましい。

【0056】プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程において、界面活性剤を添加することが好ましい。該界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリアルアミン（例えばナイミーンS-215日本油脂社製）、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイド、カチオンF B、カチオンF 2-40E等のカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸、ニューレックスTAB、ラビゾール80等のアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレート（例えばノニオンST221）等の両性界面活性剤等、プリンヌクレオチドの細胞膜透過を促進するものが好ましい。該界面活性剤は、通常0.1~50mg/ml、好ましくは1~20mg/mlの濃度で用いられる。

【0057】プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する工程の反応は、pH6~8に調整し、温度20~40℃に保ち1~48時間行う。反応終了後、反応液中に生成蓄積したプリンヌクレオチドを採取する方法は、菌体を除去して濾過精析する方法、活性炭処理法、あるいはイオン交換樹脂法等の公知の方法により実施できる（遠藤 熱ら、化学工学会（編）「バイオセパレーションプロセス便覧」、共立出版（1996））。

【0058】以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。遺伝子工学的手法は断らない限り、モレキュラー・クロニング第2版記載の方法に準じて行った。

#### 【実施例】

【0059】実施例1 P<sub>1</sub>プロモーター支配下にエシユリヒア・コリのXMPアミナーゼ遺伝子を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMP生産菌の造成および該微生物によるGMPの生産

(1) XMPアミナーゼ遺伝子の発現を温度によって制御可能な誘導発現プラスミドpLAC857の造成  
熱誘導発現プラスミドpLAC857は、公知のプラスミドpPLA66から以下の2つのステップを経て構築した。pPLA66は、P<sub>1</sub>プロモーターおよびtrpLのSD配列の下流にXMPアミナーゼ遺伝子を連結することにより造成されたXMPアミナーゼの高発現プラスミドである（Biosci. Biotech. Biochem., 61, 840 (1997)）。

【0060】温度感受性リプレッサー遺伝子cI857をプラスミドpPLA66へ、以下の方法で挿入した。pPLA66 1μgをEcoRI（5単位）およびBglII（5単位）で切断した。該切断物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、P<sub>1</sub>プロモーターおよびエシユリヒア・コリ由来のXMPアミナーゼ遺伝子（guaA遺伝子）部分を含むDNA断片をQIAGEN社製QIAEXIIを用いてゲルから回収した。cI857遺

伝子を含有するプラスミドpPAC31（WO98/12343号）1μgをEcoRI（5単位）およびBamHI（5単位）で切断した。該切断物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、cI857遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子およびエシユリヒア・コリ由来の複製起点を含有するDNA断片をゲルから回収した。

【0061】該遺伝子を含有するDNA断片と先に調製したguaA遺伝子を含有するDNA断片を宝酒造社製のライゲーションキットを用いて連結処理した。該連結処理液を用いてエシユリヒア・コリJM109（宝酒造社製）を形質転換後、100μg/mlアンピシリンを含む寒天培地に塗布し、アンピシリンに耐性となった形質転換体を得た。

【0062】得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。該プラスミドを各種制限酵素で切断解析した結果、P<sub>1</sub>プロモーター支配下に連結されたXMPアミナーゼ遺伝子、cI857遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子およびエシユリヒア・コリ内で自律複製可能なプラスミドの複製起点からなる構造を有するプラスミドpLA857を取得した。

【0063】該pLA857へ、コリネバクテリウム内で自律複製可能なプラスミドの複製起点を、以下の方法で挿入した。pLA857 1μgを本プラスミド上に唯一存在するPstI（5単位）で切断し、該切断物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、ゲルから回収し、pLA857のPstI切断物を取得した。

【0064】コリネバクテリウム・アンモニアゲネスで複製可能なプラスミドベクターpCG116（特開平1-265892号）1μgをPstI（5単位）で切断し、再結合を防止するためアルカリホスファターゼ処理によるDNAのリン酸化後、フェノール抽出処理、エタノール沈殿を行い、pCG116のPstI切断物を取得した。

【0065】上記で取得した、pLA857のPstI切断物とpCG116のPstI切断物をライゲーションキット（同上）を用いて連結処理した。該連結処理により取得したDNA 1μgを用い、電気パルス法（App 1. Microbiol. Biotechnol., 30, 283 (1989)）によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872株を形質転換し、スペクチノマイシン100μg/mlを含む寒天培地（グルコース 0.5%、ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.5%、塩化ナトリウム 0.25%、寒天 1.5%、アデニン 10mg/L、グアニン 10mg/L（pH7.2））に塗布した。

【0066】スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。該プラスミドを各種制限酵素で切断解析し、得られた形質転換体が図1に示した目的の構造を有するプラスミドpLAC857を保有していることを確認した。

【0067】pLAC857を有するコリネバクテリウ

ム・アンモニアゲネスATCC6872/pLAC857はブダペスト条約に基づいて、平成11年2月5日付けで工業技術院生命工学技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-0046)にFERM BP-6639として寄託されている。

【0068】(2) FERM BP-1261株にpLAC857を導入した株の有するXMPアミナーゼ活性の測定

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pLAC857 (FERM BP-6639) から 10  
アルカリ溶菌法によりpLAC857を抽出した。

【0069】該プラスミドを用い、電気パルス法(上記)によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMP生産菌FERM BP-1261(特許番号第2618383号:アデニンのリーキー要求性およびグアニン要求性)を形質転換した。スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

【0070】該プラスミドを各制限酵素で切断解析し、得られた形質転換株がpLAC857を保有していることを確認した。pLAC857を有するXMP生産菌FERM BP-1261株を、スペクチノマイシン100 $\mu$ g/mlを含むA培地(A寒天培地から寒天を除いたもの)で、30℃および37℃条件下、24時間、振盪培養した。

【0071】培養後、遠心分離により菌体を取得した。該菌体を100mM Tris-HCl (pH7.0)で2回洗浄後、同緩衝液10mlに懸濁した。該菌体懸濁液にガラスビーズ(シンマルエンタープライゼス社製0.1~0.2 $\phi$ )10gを添加し、氷冷しながらホモゲナイザー(日本精機社製)で10分間破砕処理した。

【0072】得られた処理液を4℃にて10分間遠心(14000 $\times$ g)し、上清を細胞抽出液として回収した。予め4℃に保温した細胞抽出液を添加した反応液[160mmol/L Tris-HCl (pH8.6), 12mmol/L ATP Na<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O, 16mmol/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 40mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 1.15mlに0.1mlの0.3mol/L XMPを加えて42℃で反応を開始した。15分後に、反応液に3.9mlの3.5%過塩素酸を加えて反応を停止させた。

【0073】該反応停止液を、3000rpmで10分間遠心分離後、上清の290nmにおける吸光度を測定した。1分間に1 $\mu$ molのGMPを生成させる活性を1単位(U)とし、蛋白質1mg当たりの比活性を算出した。蛋白質は、プロテイン・アッセイキット(バイオラッド社製)を用いて定量した。

【0074】結果を第1表に示した。30℃で培養した菌体では活性が検出されなかったのに対し、37℃で培養した菌体では活性が検出された。本結果は、pLAC 50

857を有するFERM BP-1261株において、XMPアミナーゼ遺伝子の発現がP<sub>1</sub>プロモーターの支配下であり、該酵素活性を温度によって制御できることを示している。

【0075】

【表1】

第1表

培養温度	比活性 ( $\mu$ mol/min/mg protein)
30℃	検出されず
37℃	0.25

【0076】(3) pLAC857を有するXMP生産菌FERM BP-1261株によるGMPの生産  
pLAC857を有するFERM BP-1261株をストレプトマイシン20 $\mu$ g/mlを含有するA寒天培地上で30℃、2日間培養後、得られた菌体をストレプトマイシン20 $\mu$ g/mlを含有する60mlのCシード培地[グルコース 5%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, NaCl 0.25%, 尿素 0.3%, アデニン 150mg/L, グアニン 150mg/L (pH7.2)]を添加した250ml容三角フラスコに接種し、30℃、24時間浸とう培養した。

【0077】得られた培養液全量を、0.94LのDシード培地[グルコース 8.8%, 肉エキス 1.7%, ペプトン 1.7%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.167%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.167%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.167%, アデニン 333mg/L, グアニン 350mg/L, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 33mg/L, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 17mg/L, MnSO<sub>4</sub> 4~6H<sub>2</sub>O 6.7mg/L,  $\beta$ -アラニン 25mg/L, L-システイン 33mg/L, ビオチン 167 $\mu$ g/L, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 1.3mg/L, チアミン 8.3mg/L (pH7.2)]を添加した2L容発酵槽に接種し、5.5mol/Lアンモニア水でpHを7.2に保ちつつ、30℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で24時間培養を行った。

【0078】得られた培養液120mlを、0.88LのF発酵培地[グルコース 8%, オルソリン酸 1.67%, KOH 1.29%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1.2%, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 123mg/L, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 24.6mg/L, MnSO<sub>4</sub> 4~6H<sub>2</sub>O 12.3mg/L, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 12.3mg/L,  $\beta$ -アラニン 18.5mg/L, L-システイン 24.6mg/L, ニコチン酸アミド 6.2mg/L, ヒスチジン 24.6mg/L, ビオチン 185 $\mu$ g/L, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 2.5mg/L, アデニン 203mg/L, グアニン 10mg/L (pH7.2)]を添加した2L容発酵槽に接種し、5.5mol/Lアンモニア水でpH7.2に保ちつつ、28℃、攪拌600rpm

m. 通気1L/minの条件で44時間培養を行った。  
 【0079】培養終了後の、培地上清中のXMPおよびGMPの蓄積量を、HPLCを用いて次のようにして定置した。

#### HPLC分析

カラム: Asahipak GS-320H (旭化成社製)

溶出液: 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.0)

流速: 1 ml/min

検出: UV254 nm

XMPおよびGMPの蓄積量は、UV254 nmの吸光度により測定し、吸光強度をスタンダードと比較することにより定置した。

【0080】HPLC分析の結果、XMPは27.2 g/L生成蓄積していたが、GMPは検出されなかった。XMPアミナーゼ遺伝子を誘導発現させるために、培養ブ罗斯を40℃に昇温し、5.5 Mアンモニア水でpH 7.2に保ちつつ、攪拌600 rpm、通気1L/minの条件で6時間熱処理を行った。

【0081】該熱誘導処理を施したXMPの発酵液に、グルコース 2.5%、フィチン酸10 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.4 g/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9.36 g/L、アデニン 96.9 mg/L、ナイミーンS-215 10 g/Lを添加した後、5.5 Mアンモニア水でpHを7.4に保ちつつ、40℃、攪拌600 rpm、通気1L/minの条件で24時間反応を行った。反応後、培地上清中のGMPの蓄積量を、上記HPLC分析条件で定置した。HPLC分析の結果、20.8 g/LのGMPの生成蓄積が認められた。

【0082】実施例2 イソントレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMPアミナーゼ遺伝子を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMP生産菌の造成および該微生物によるGMPの生産

(1) PCR法によるXMPアミナーゼ遺伝子の増幅とクローニング

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMPアミナーゼ遺伝子の単離は、塩基配列に基づきPCR法により、次のようにして行った。

【0083】まず、XMPアミナーゼ遺伝子の両末端に位置し、それぞれ制限酵素AflIII、BamHI切断部位を有する配列番号1および2に示すオリゴヌクレオチドを合成した。また、隣型とするコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872の染色体DNAの調整は、グリシン存在下で培養した菌体をリゾチームとアクロモベプチダーゼ処理し、プロトプラストを調製する方法(特開平6-225776)に従って行った。

【0084】染色体DNA 0.1 μgとプライマーとして該オリゴヌクレオチド各0.25 μmol/LおよびタックDNAポリメラーゼ(宝酒造社製) 2.5 ユニ

ットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μmol/L、50 mmol/L 塩化カルウム、1.5 mmol/L 塩化マグネシウムおよび0.001%ゼラチンを含有する10 mmol/L トリス-塩酸緩衝液(pH 8.3) 0.1 mlに添加し、PCRを行った。

【0085】PCRは、94℃で90秒間、50℃で120秒間、72℃で120秒間の反応を1サイクルとして、10サイクル繰り返し、94℃で90秒間、40℃で120秒間、72℃で120秒間の反応を1サイクルとして、10サイクル繰り返し、更に、94℃で90秒間、40℃で120秒間、72℃で180秒間の反応を1サイクルとして、20サイクル繰り返した後、72℃で360秒間反応する条件で行った。

【0086】得られた反応液を用い、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とする約1.6 kbのDNA断片を回収した。該DNA断片を制限酵素AflIII(5単位)およびBamHI(5単位)で切断し、DNA断片の両端がAflIIIまたはBamHIで処理された約1.6 kbの切断物をアガロースゲル電気泳動法により分離、回収した。

【0087】(2) XMPアミナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御可能な誘導発現プラスミドpGUA2の造成

誘導発現ベクターpCEX2(特開平3-224259号)を用い、XMPアミナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御できるプラスミドを、以下のようにして構築した。

【0088】pCEX2は、コリネバクテリウム・グルタミカムのイソントレートリアーゼ遺伝子の発現制御領域および転写終結シグナル配列を含むベクターで、マルチクローニング部位に挿入された外来遺伝子の発現は、糖質存在下では抑制され、酢酸等の非糖質存在下で誘導される。

【0089】pCEX2ベクターDNA 1 μgをAflIII(0.5単位)で部分切断した後、BamHI(5単位)で切断し、イソントレートリアーゼ遺伝子の発現制御領域、転写終結シグナル領域、スペクチノマイシン耐性遺伝子およびコリネバクテリウム・グルタミカム内で自律複製可能なプラスミドの複製起点を含む7.6 kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離、回収した。

【0090】該DNA断片と上記実施例2(1)で取得したXMPアミナーゼ遺伝子のPCR増幅断片を連結処理し、連結DNAを取得した。該連結DNA 1 μgを用い、電気パルス法を用いてコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872株を形質転換し、スペクチノマイシン100 μg/mlを含むA寒天培地に塗布した。

【0091】スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出

10

20

30

40

50

した。該プラスミドDNAを各種制限酵素で切断解析し、得られた形質転換株が図2に示した目的の構造を有するプラスミドpGUA2を有することを確認した。

【0092】(3) FERM BP-1261株にpGUA2を導入した株の有するXMPアミナーゼ活性の測定pGUA2を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872株からアルカリ溶菌法によりpGUA2を抽出した。

【0093】該プラスミドを用い、電気パルス法によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMP生産菌FERM BP-1261(アデニンのリーキー要求性およびグアニン要求性)を形質転換した。スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

【0094】該プラスミドを各種制限酵素で切断解析した結果、形質転換株がpGUA2を保有していることを確認した。pGUA2を有するXMP生産菌FERM BP-1261株を、スペクチノマイシン100μg/mlを含むA培地および該培地のグルコースを酢酸アン\*

\*モニウムに代替した培地の2種類の培地で、30℃にて24時間、振盪培養した。

【0095】得られた培養液から、それぞれ菌体を取得し、実施例1(2)と同様にして細胞抽出液を調製した。これら抽出液を用い、これら抽出液中のXMPアミナーゼ活性を実施例1(2)に記載の方法に準じて測定した。

【0096】結果を第2表に示した。グルコースを炭素源として培養した菌体では、極めて低レベルの活性しか検出されなかったのに対し、2% 酢酸アンモニウムを炭素源として培養した菌体では高レベルの活性が検出された。

【0097】該結果は、pGUA2を有するFERM BP-1261株において、XMPアミナーゼ遺伝子の発現がイソシトレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にあり、該酵素活性を炭素源によって制御できることを示している。

【0098】

【表2】

第2表

炭素源	比活性 (μmol/min/mg protein)
グルコース	0.05
酢酸アンモニウム	0.38

【0099】(4) XMP生産菌FERM BP-1261株にpGUA2を導入した株によるGMPの生産pGUA2を有するFERM BP-1261株を用い、実施例1(3)と同様な培養条件でXMP発酵を行った。培養終了後の培地上清中のXMPおよびGMPの生成量を実施例1(3)と同様な方法により定置した。

【0100】その結果、XMPの蓄積量は、18.4g/Lであった。GMPは検出されなかった。発酵終了後、XMPアミナーゼ遺伝子を誘導発現させるために、酢酸アンモニウムを最終濃度が2%になるように添加し、5.5mol/L アンモニア水でpH7.2に保ちつつ、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で10時間培養を継続した。

【0101】酢酸アンモニウムで誘導処理を施した該培養液に、グルコース 2.5%、フィチン酸 10g/L、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 4.4g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.36g/L、アデニン 96.9mg/L、ナイミーンS-215 10g/Lを添加した後、5.5mol/L アンモニア水でpHを7.4に保ちつつ、40℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で24時間反応を行った。

【0102】反応後、該反応液の培地上清中のGMPの蓄積量を実施例1(3)に記載の方法に準じて定置した。該反応液に、GMPは14.4g/Lの生成蓄積さ

れていた。

【0103】実施例3 イソシトレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にエシェリヒア・コリのイノシングアノシンキナーゼ遺伝子を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのイノシリン生産菌の造成および該微生物によるIMPの生産

(1)PCR法によるイノシングアノシンキナーゼ遺伝子の増幅とクローニング

エシェリヒア・コリのイノシングアノシンキナーゼ遺伝子の単離は、公知の塩基配列(WO91/08286号)に基づきPCR法により、次のようにして行った。

【0104】イノシングアノシンキナーゼ遺伝子の両末端に位置し、それぞれ制限酵素AflIIおよびBamHI切断部位を有する配列番号3および4に示すオリゴヌクレオチドを合成した。イノシングアノシンキナーゼ遺伝子の鋳型として、エシェリヒア・コリHM70/pBM2株(WO91/08286号)が保有するプラスミドpBM2を用いた。

【0105】該プラスミドDNA 0.1μgとプライマーとして該オリゴヌクレオチド各0.25μmol/LおよびタックDNAポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200μmol/L、50mmol/L 塩化カリウム、1.5mmol/L 塩化マグネシウムおよび0.0001%ゼラチンを含有する10mmol/Lトリ

ス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 0.1 ml に添加し、PCRを行った。

【0106】PCRは、94℃で90秒間、50℃で120秒間、72℃で120秒間の反応を1サイクルとして、10サイクル繰り返した後、94℃で90秒間、40℃で120秒間、72℃で120秒間の反応を1サイクルとして、10サイクル繰り返す。更に、94℃で90秒間、40℃で120秒間、72℃で180秒間の反応を1サイクルとして、20サイクル繰り返した後、72℃で360秒間反応する条件で行った。

【0107】得られたPCR反応産物とPCR産物クローニング用ベクターpT-Advベクター(クローンテック社製)とを連結処理した。該連結処理により取得したDNA 1μgを用い、エシエリヒア・コリDH5αを形質転換し、アンピシリン100μg/mlを含むL寒天培地に塗布した。

【0108】アンピシリンに耐性となった形質転換体から、アルカリ溶菌法によりプラスミドpT-AIを抽出した。該プラスミドpT-AIの構造を、各種制限酵素を用いて解析し、該プラスミドがイノシングアノシンキナーゼ遺伝子(1.3kb)、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、およびエシエリヒア・コリ由来の複製起点を有することを確認した。

【0109】(2) イノシングアノシンキナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御可能な誘導発現プラスミドpIGK2の造成

誘導発現ベクターpCEX2(特開平3-224259号)を用い、イノシングアノシンキナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御できるプラスミドを、以下のようにして構築した。

【0110】pCEX2ベクターDNA 1μgをKpnI(5単位)で切断し、イソトレートリナーゼ遺伝子の発現制御領域、転写終了シグナル領域、スペクチノマイシン耐性遺伝子およびコリネバクテリウム・グルタミカム由来の複製起点を含む7.6kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離、回収した。

【0111】上記実施例3(1)で得たイノシングアノシンキナーゼ遺伝子を含有するプラスミドpT-AI 1μgをKpnI(5単位)で切断した後、酸リン酸処理した。該KpnI切断DNA断片と上記pCEX2のKpnI切断断片を連結処理した。得られた連結混合液を用い、エシエリヒア・コリDH5αを形質転換後、100μg/mlアンピシリンを含むL寒天培地上に塗布し、アンピシリン耐性となった形質転換株を得た。

【0112】得られた形質転換体から、アルカリ溶菌法によりプラスミドを抽出した。該プラスミドを各種制限酵素で切断解析した結果、図3に示した目的の構造を有するプラスミドpIGK2を得た。該DNA 1μgを用い電気パルス法によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872株を形質転換し、スペクチ

ノマイシン100μg/mlを含むA寒天培地に塗布した。

【0113】スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出し、pIGK2を有することを確認した。pIGK2を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pIGK2はブダベスト条約に基づいて、平成11年2月5日付けで工業技術院生命工学校術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-0046)にFERM BP-6638号として寄託されている。

【0114】(3) FERM BP-2217株にpIGK2を導入した株の有するイノシングアノシンキナーゼ活性の測定

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pIGK2(FERM BP-6638号)からアルカリ溶菌法によりプラスミドpIGK2を抽出した。

【0115】該プラスミドを用い、電気パルス法によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのイノシン生産菌FERM BP-2217(特許番号第2578496号; アデニンのリーキー要求性およびグアニン要求性)を形質転換した。スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

【0116】該プラスミドを各種制限酵素で切断解析し、得られた形質転換株がpIGK2を保有していることを確認した。pIGK2を有するイノシン生産菌FERM BP-2217株をスペクチノマイシン100μg/mlを含むA培地および該培地のグルコースを酢酸アンモニウムに代替した培地の2種類の培地で、30℃、24時間培養した。

【0117】得られた培養液より、菌体を取得し、これら菌体から実施例1(2)に記載の方法に従って細胞抽出液を調製した。これら抽出液中のイノシングアノシンキナーゼの活性を以下の方法で測定した。予め30℃に保温した反応液(100mmol/L HEPES緩衝液(pH7.2)、10mmol/L MgSO<sub>4</sub>、50mmol/L KCl、1mmol/L ATP、1mmol/L イノシン)0.1mlに細胞抽出液0.01mlを添加し、30℃、30分間程度反応させた。

【0118】反応の間、経時的に反応液の一部をサンプリングし、0.2mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>でpH2.6に調整)を用い、サンプリング液を1/20に希釈して反応を停止させた。該反応停止液中のイノシンおよびIMPの生成量を、以下のHPLC分析条件で定量した。

【0119】HPLC分析条件

カラム: Asahipak GS-320H(旭化成社製)

溶出液: 0.2mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH2.6)

流速: 1 ml/min

検出: UV254nm

イノシンおよびIMPの蓄積量は、UV254nmの吸光度により測定し、吸光強度をスタンダードと比較することにより定量化した。1分間に1μmolのIMPを生成させる活性を1単位(U)とし、蛋白質1mg当たりの比活性を算出した。

【0120】蛋白質は、プロテイン・アッセイキット(バイオラッド社製)を用いて定量化した。結果を第3表に示した。グルコースを炭素源として培養した菌株で

\*は、極めて低レベルの活性しか検出されなかったのに対し、2% 酢酸アンモニウムを炭素源として培養した菌株では高レベルの活性が検出された。本結果は、pIGK2を有するFERM BP-2217株において、イノシングアノシンキナーゼ遺伝子の発現がイソントレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にあり、該酵素活性を炭素源によって制御できることを示している。

【0121】

【表3】

第 2 表

炭素源	比活性 (μmol/min/mg protein)
グルコース	0.02
酢酸アンモニウム	0.34

【0122】(4) pIGK2を有するイノシン生産菌FERM BP-2217株によるIMPの生産  
pIGK2を有するFERM BP-2217株をストレプトマイシンを20μg/ml含有するA寒天培地上で30℃、2日間培養した。

【0123】培養後、得られた菌体を、60mlのストレプトマイシンを20μg/ml含有するC1シード培地(グルコース 5%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, NaCl 0.25%, 尿素 0.25%, アデニン 300mg/L, グアニン100mg/L (pH7.2))を添加した250ml容三角フラスコに接種し、30℃、24時間浸漬とう培養した。

【0124】得られた培養液全量を、0.94LのD1シード培地(グルコース 7%, 肉エキス 1%, ペプトン 1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, アデニン 300mg/L, グアニン 300mg/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/L, MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 10mg/L, β-アラニン 16mg/L, L-システイン 20mg/L, ビオチン 30μg/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2mg/L, チアミン 6mg/L (pH7.2))を添加した2L容発酵槽に接種し、5.5mol/Lアンモニウム水でpHを7.2に保ちつつ、30℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で24時間培養した。

【0125】得られた培養液120mlを、0.88LのF1発酵培地(グルコース 8%, CSL 2.07%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.21%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.21%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.43%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 105mg/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10.4mg/L, MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 20.7mg/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.2mg/L, パントテン酸カルシウム 10.4mg/L, L-システイン 20.7mg/L, ニコチン酸 5.2mg/L, ビオチン93.8

μg/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.51mg/L, アデニン313mg/L (pH7.2))を添加した2L容発酵槽に接種し、5.5M アンモニウム水でpH7.2に保ちつつ、28℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で44時間培養した。

【0126】培養終了後、該培養上清中のイノシンおよびIMPの生成蓄積量を実施例3(3)に記載の方法に従って定量化した。培養上清中のイノシンの生成蓄積量は、23.1g/Lであり、IMPは検出されなかった。

【0127】培養終了後、イノシングアノシンキナーゼ遺伝子を誘導発現させるために、酢酸アンモニウムを最終濃度が2%になるように添加し、5.5mol/Lアンモニウム水でpH7.2に保ちつつ、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で10時間培養を継続した。

【0128】得られた培養液に、グルコース 2.5%, フィチン酸 10g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.4g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.36g/L, アデニン 96.9mg/L, ナイミーンS-215 10g/Lを添加した後、5.5mol/Lアンモニウム水でpHを7.4に保ちつつ、40℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で24時間反応を行った。

【0129】反応後、反応上清中のIMPの蓄積量を実施例3(3)に記載の方法に従って定量化した。37.7g/LのIMPが反応液中に生成蓄積されていた。

【0130】

【発明の効果】本発明により、調味料として大きな需要のあるプリンヌクレオチドを同一発酵槽内で効率よく製造するための製造法および該製造法に用いることのできる微生物を提供することができる。

【0131】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1: 合成DNA

配列番号2:合成DNA

\* [0132]

配列番号3:合成DNA

[配列表]

配列番号4:合成DNA

\*

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

&lt;120&gt; A METHOD OF PRODUCING PRIMUMNUCLEOTIDE

&lt;130&gt; H12-0062A4

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP99/029738

&lt;151&gt; 1999-02-08

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

[0133]

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

ccacgactta aagaagttac ctatgtgact caacctgcaa caactcc

47

[0134]

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

aaaggaacct aagaagttta ctccactca atggttccca

40

[0135]

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 3

ccacgactta aagaagtgac ttatgtgaaa ttcccgcta aacgtaa

47

[0136]

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

aaaggaacca caataactta acgaatccaa taagaactctt

40

【図面の簡単な説明】

50 【図1】 図1は、プラスミドpLAC857の構造を



示す図である。

【図2】 図2は、プラスミドpGUA2の構造を示す図である。

【図3】 図3は、プラスミドpIGK2の構造を示す図である。

【符号の説明】

P<sub>L</sub> : P<sub>L</sub>プロモーター

quaA : エシェリヒア・コリ由来のXMPアミナーゼ遺伝子

C.qlt ORI : コリネバクテリウム・グルタミカム複製起点

\* Spc<sup>r</sup> : スペクチノマイシン耐性遺伝子

c1857 : 温度感受性リプレッサー遺伝子

P<sub>TCT</sub> : コリネバクテリウム・グルタミカム由来のインシトレートリナーゼ遺伝子発現制御領域

T<sub>TCT</sub> : コリネバクテリウム・グルタミカム由来のインシトレートリナーゼ遺伝子ターミネーター

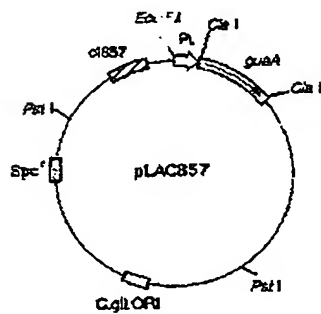
1qk : エシェリヒア・コリ由来のイノシングアノシンキナーゼ遺伝子

Km<sup>r</sup> : カナマイシン耐性遺伝子

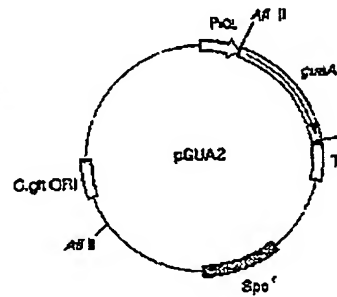
Ap<sup>r</sup> : アンピシリン耐性遺伝子

\* E.coli ORI : エシェリヒア・コリ複製起点

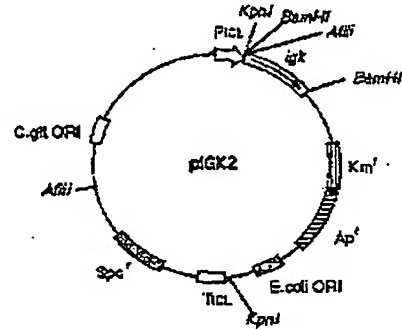
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

(C12P 19/32

C12R 1:15)

識別記号

F I

シーコード (参考)